

(11)特許出願公開番号

(43)公開日 平成8年(1996)10月8日

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】少なくとも生体分子の一部のコード配列を確認するのに適した装置であって、

1) ニア・フィールド・プローブを有し、生体分子の一部の高分解能化学分析を行う手段と、

2) 前記生体分子の一部の前記高分解能化学分析を、参照生体分子の広域スペクトル内容と相関させて、前記生体分子の一部のコード配列決定を行う手段と、を備える装置。

【請求項2】1) 前記生体分子の一部と相互作用する放散電磁界を測定する手段を有する、少なくとも1つの開口ニア・フィールド走査プローブと、

2) 前記放散電磁界の変動を測定して、前記生体分子の一部の前記高分解能化学分析を行う光学干渉計検出器と、を備える請求項1記載の装置。

【請求項3】前記高分解能化学分析を、前記参照生体分子の広域スペクトル内容と相関させるプログラマブル・コンピュータを備える、請求項1記載の装置。

【請求項4】前記ニア・フィールド・プローブおよび前記生体分子の一部を相対的に走査する手段をさらに備える、請求項2記載の装置。

【請求項5】前記走査する手段は、圧電チューブを有する、請求項4記載の装置。

【請求項6】1) 前記生体分子の一部の蛍光を測定する開口ニア・フィールド走査プローブと、

2) 前記生体分子の一部から放出される蛍光光子を計数する光子・カウンタを有し、前記生体分子の一部の前記高分解能化学分析を行う検出器と、を備える請求項1記載の装置。

【請求項7】前記高分解能化学分析を、前記参照生体分子の広域スペクトル内容と相関させるコンピュータを備える、請求項6記載の装置。

【請求項8】前記開口ニア・フィールド走査プローブおよび生体分子の一部を相対的に走査する手段をさらに備える、請求項6記載の装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、生体分子の少なくとも一部のコード配列を確認するのに適した装置および方法に関する。

## 【0002】

【発明が解決しようとする課題】4つのクラスの生物学的分子、すなわちタンパク質、脂質、炭水化物、核酸を含む生物学的分子が知られている。核酸は、2つの包含されたクラス、すなわちすべての細胞の遺伝子要素であるDNAと、タンパク質の合成に通常作用するRNAとを含んでいる。

【0003】本発明の分野は、一般には生体分子に関係しているが、現在、教育学のためのワーキング・ポイント、DNAを含む生体分子を参照することにより確立

2

されている。DNAは染色体内のすべての遺伝情報を運ぶ基本的な遺伝分子であるから、DNAは重要視されている。

【0004】DNAは、デオキシリボ核酸を表している。大半の細胞のDNAは、細胞核内にある。その構造は、ヌクレオチドと呼ばれる比較的単純な分子の長い鎖を有している。ヌクレオチドは、3つの部分、すなわち(1)1つの特殊な酸素原子が脱離したリン酸塩基(接頭辞が“デオキシ”である)、(2)“リボース”と呼ばれる糖と、(3)塩基とを含んでいる。1つのヌクレオチドを他のヌクレオチドと区別するのは塩基であり、したがってヌクレオチドを識別するには塩基を特定することで十分である。DNAヌクレオチド内に存在する4種類の塩基は、アデニン(A)、グアニン(G)、シトシン(C)、チミン(T)である。

【0005】DNAの一本鎖は、ビーズの鎖のように数珠状につながった多数のヌクレオチドより構成されている。DNAは、通常、二本鎖、すなわち周知のDNA二重らせんの形で、ヌクレオチドずつ対になった2本の一本鎖で構成されている。

【0006】DNAは、そのヌクレオチド配列にわたって、広大な配列の情報を有している。したがって、ヌクレオチドの順序(直線列とみなせる、例えばATTCGGACC...)は、かなり変化する。ヌクレオチド配列は、特に、シングル・ヌクレオチド、デュプレット(隣接する2つの塩基)、コドン(連続する3つの塩基)、遺伝子(1つの酵素をコード化する鎖の一部)、任意のヌクレオチドの鎖、または生物に対するDNA分子の全セットを含む(例えば、生物細胞に対して $3 \times 10^9$ 個のヌクレオチド)ゲノムを有することができる。

【0007】本願発明は、生体分子のコード配列を決定するための新規な手法、装置、および方法に関する。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】まず第1に、生体分子のコード配列決定の能力を有することが、なぜ重要かつ大きな有効性を持つかについて説明する。第2に、この努力は、このような能力を実現し実施する試みにおける、クリシットな(c l i c i t)問題、困難性、抑制を補助することができる。第3に、関連する従来技術に対して、なにが関係するかを明らかにする。最後に、本発明の新規な装置および方法について定義し、生体分子のコード配列決定を含む質的に新規な手法を実現するに際し、克服すべき問題を指摘し解決することについて検討する。さらに、従来技術に対抗する新規な装置および方法を提供し、これにより新規および非自明性を明らかにし、およびその効果を証明する。

【0009】したがって、まず第1に、ヌクレオチド配列決定情報が何とかして得られて、この情報を通常のコンピュータ技術でアクセスできるものと仮定する。した

3

4

がって、コンピュータにおいて、特に、RNA合成、反転パリンドローム、潜在的なZ-DNAの好適な断片（交互するプリン伸張およびピリミジン伸張）、他の既知のDNA配列との同一性、突然変異の検出、遺伝子型、遺伝的データベース比較、または構成要素であるヌクレオチドおよび完全なゲノムに対するそれらの位置によって、ヒトゲノムを特定する大規模な超配列決定に対してヌクレオチド配列を走査することができる（いくつかのケースについて、少なくとも理論的に）。

【0010】この詳細は、生体分子のコード配列決定能力の重要性および有用性を自明にするものと信じられる。同時に、このような配列決定方法の能力を実行する仮定の方法に含まれる、理解の困難性、問題、抑制を引き起こす。例えば、ゲノムは、約 $10^9$ 個のヌクレオチドを含み、約0.6mの平均長を有し、1個のヌクレオチドは、約1~2オングストロームの平均長さを有している。したがって、候補的な方法は、ヌクレオチドをおそらく破壊することなしに、隣接するヌクレオチドから1つのヌクレオチドを、少なくとも何とかして分解し、かなりの数のヌクレオチドを、正確かつ精密に、一定の期間内に分解しなければならない。

【0011】本発明に関連する2つの重要かつ代表的な従来技術は、ゲル電気泳動および自由溶液電気泳動の分離技術を含んでいる。

【0012】ゲル電気泳動は、配列決定反応の際に生成されるDNA断片の物理的分離を必要とする。通常のゲル電気泳動における説明は、(1) J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatisらによる“Molecular Cloning: A Laboratory Manual” (Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. 1989), (2) A. T. BankierおよびB. G. Barrellによる“Nucleic Acids Sequencing: A Practical Approach”, Eds. E. M. Howe, C. J. Rowlings, IRL Press, Oxford 1989, pp. 37-73に開示されている。

【0013】概説すると、ゲル電気泳動法は、代表的に、(1) 配列決定すべきDNA鎖を、DNA鎖の同一箇所から始まる片に断断するステップと、(2) 例えば、末端塩基(A, T, C, またはG)に応じて異なる色で蛍光する蛍光タグで各断片を標識するステップと、(3) 減少分子サイズのパンドに断片を連続的に分離するゲル電気泳動を行うステップと、(4) 各パンドの末端標識を調べる適当な検出手段を用いるステップとを含んでいる。

【0014】このためには、現在のゲル電気泳動法は、電界内でパンドを分離するための長さを有するDNA分子の移動度の分散に頼っている。したがってゲル電気泳

動法の適用は、現在理解されているように、約700個の塩基（ヌクレオチド）に不利に制限されている。というのは、700個のヌクレオチドよりも長い分子の長さに対しては、分散が飽和するからである。さらに、低い分散および移動度の故に、700個のヌクレオチドを分離するには数時間を要する。この速度は、鎖の数個のレーン/例えば最大36個の連続する異った部分を有することによって、さらに増大することは事実である。

【0015】本発明の重要な利点は、上述したゲル電気泳動の現在の困難性または欠点にもかかわらず、これらの制限を補いまたは改善することができ、したがって本発明の観点から変更または再評価されて、ゲル電気泳動は、かなりの有用性を与えることができることである。この利点について、以下に明らかにする。

【0016】本発明は、化学的に複雑な背景に対して、特に区別可能な生体分子の少なくとも一部を分解できる方法を含んでいる。一実施例では、本発明により、ポリアクリルアミド・ゲル内で、大きな二本鎖DNA分子のコード配列を決定するのに通常の電気泳動装置を用いることができる。

【0017】この利点の説明において、現在のゲルに基づいた技術の性能を制限する臨界パラメータは、DNA配列決定反応のパンド拡張である。というのは、50~400V/cmの範囲で変化する連続電界強度で、DNAは一定距離のゲルにわたって分離されるからである。パンド幅のサイズ依存性は、拡散および熱勾配拡大のような、ゲル内での核酸断片の再配向および移動の種々のメカニズムの結果である。

【0018】次に、ポリアクリルアミドまたはアガロース・ゲルのような、化学的に架橋したポリマ溶液を生体分子試料が移動すると、全摩擦係数は、ゲル内の孔径、試料のサイズ、電界強度の複数次関数となり、これにより分解能が制限される。

【0019】毛管またはパルス・フィールドの利用に基づいた、いくつかの手法は、分解能のこの制限を部分的に克服することができる(C. R. CantorらによるPulsed-Field gel electrophoresis of very large-DNA molecules Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry, vol. 17, 287, 1988)。

【0020】検出装置は、試料が有限の検出容積に達すると、試料の無限に細い部分を検査せず、これにより1つのヌクレオチドの分解を妨げるという事実に基づいて、検出装置の空間分解能を、パンド拡張の原因とすることもできる。現在の共焦・蛍光顕微鏡は、典型的に、ファースト・フィールド検出装置を与える。この検出装置は、信号対雑音比1、またはパンドあたり約 $10^{17}$ モルの蛍光標識DNA、および $10\mu\text{m}$ から変化する空間分

解能として定義された、限界感度で、毛管またはスラブ・ゲルを調べる (Smith L. M. らによる Nature, vol. 321, 12 June, 1986)。ゲル電気泳動による配列決定解析におけるバンド拡張のいくつかの理論的手法 (Y. F. Chen らによる Anal. Chem., 62, 496-503, 1990) に基づいて、バンドの理論的ピーク幅を、開始条件 (すなわち、注入時間および容積)、検出 (フォーカスされたレーザ・ビームのスポット・サイズ)、拡散および熱勾配分散の複雑な関数となるように決定することができる。

【0021】次に、注入プロセスで始まる開始条件を説明する。

【0022】ゲル内に生体分子を設けることを含む注入プロセスの際、緩衝状態の境界が動くことによって、生体分子は積み上げられず、したがって生体分子は、ゲル内でのそれらの電気泳動速度に相当する異なる速度でゲル内に入り、これによりバンド幅の分散への正味効果に寄与する。生体分子の連続する検出には、ガウスビーム・プロファイルのフォーカスされたレーザを用いることができる。この状況に対しては、ビーム・プロファイルの標準的な偏移を、ビーム・スポットの  $1/2$  に等しいものと推定することができる。このことは、式  $\sigma^2 = w^2 / 4$  ( $w$  はスポット・サイズである) で表される検出分散を生じる。最も普通の装置では、レンズまたは光ファイバを用いて、スラブ・ゲルまたは充填ゲルの毛管ベッセル上にレーザをフォーカスすることができる。しかし、放出放射線に対する励起放射線の直交方向の故に、光検出装置のレンズの開口数は、約  $0.20 \sim 0.75$  に制限される。例えば、毛管電気泳動におけるオン・コ

ラム検出のためのいくつかの共線的な装置が報告されている。この装置は、細い毛管と大きい開口数を用いて、多くの蛍光を集光することを可能にし、これにより感度の改良に寄与している。

【0023】ゲル電気泳動のための準備において、代表的に  $0.4 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$  すなわち  $2.4 \text{ mm}^2$  のウェル内のスラブ・ゲルの各レーン内に試料を置く。一方、例えば  $50 \mu\text{m}$  の毛管において、ゲル上部の表面積は、スラブ・ゲルの表面積の  $1/1000$  であり、これは与えられたバンド内の試料の約  $10^{-17}$  モルに相当している。したがって、試料の積み上げを利用しない試料設置条件、および検出装置の光回折スレシヨルドは、分解能に影響を与えるバンド拡張の重要なソースである。

【0024】対照的に、本発明の手順および実施例は、上述の限界を克服する革新的手法を定めている。この手法は、特定の実施例では、少なくとも  $0.1 \mu\text{m}$  の試料寸法に試料バンドをフォーカスすることのできるメカニズムと、回折制限を越えた空間分解能を可能にし、これにより濃度検出の限界を少なくとも  $1$  つの分子の質量に拡張するニア・フィールド検出装置とを用いている。

【0025】従来のゲル電気泳動の低移動度を増大させる  $1$  つの方法は、自由溶液電気泳動を用いることである。この場合には、分子長さ ( $M$  個の塩基) についての移動度に分散がない。これは、移動度 (電界によって除算された速度) が、摩擦係数によって除算された電荷に等しく、および電荷と摩擦係数の両方が、分子長さ  $M$  に比例するという事実に基づいている。Mayer らによる Anal. Chem. 1994, 66, 1777-1780 には、各断片の末端に巨大分子を付着させて、一定の摩擦を付与することが提案されている。このようにすれば、移動度は、塩基の数とはもはや無関係である。この文献に基づいた理論的計算では、ファー・フィールド検出限界を有する最良のケースでは、分散は  $5$  分間に  $3000$  個のヌクレオチドを分離することを可能にすることを示している。

【0026】最後に、大規模な自動 DNA 配列決定方法を有する、すなわち DNA 配列決定を高速に行う質量分析を与える、またはハイブリダイゼーションによって配列決定する、進歩した技術について言及する。以下の文献 1) R. J. Lewis らによる J. AM. Chem. Soc., 113, 9665, 1991 および 2) R. Drmanac らによる "Sequencing of magabasePlus DNA by Hybridization: Theory of the Method" in Genomics, vol. 4, pp. 114-118 (1989) をそれぞれ参照されたい。

【0027】本願発明者らは、従来技術とは質的に異なる生体分子コード配列決定の手法を考案した。この異なる手法は、生体分子の少なくとも一部のコード配列を確認するのに適した新規な方法および装置において明らかとなる。

【0028】この方法は、

- 1) 生体分子の一部の高分解能化学分析を行うニア・フィールド・プローブを用いるステップと、
- 2) 前記化学分析を、参照生体分子の広域スペクトル内容と相関させて、コード配列決定を行うステップと、を含んでいる。

【0029】この装置は、

- 1) ニア・フィールド・プローブを有し、生体分子の一部の高分解能化学分析を行う手段と、
- 2) 生体分子の一部の高分解能化学分析を、参照生体分子の広域スペクトル内容と相関させて、生体分子の一部のコード配列決定を行う手段と、を備えている。

【0030】このような本発明は、いくつかの重要な利点を実現できる。

【0031】まず第 1 は、本発明の新規な方法および装置は、品質、量、時間応答性のようなヌクレオチド配列決定情報を生成する内在的な能力を有している。したがって、これまでは、このような情報を必要とする常に理

論上想定された応用が、現実的となった。例えば、本発明を用いて、個々のヌクレオチドの確認（すなわち、A, G, C, T）と、完全なゲノムを含む、任意長さの鎖に対する個々のヌクレオチドの位置とを正確に反映するマップを展開することができる。

【0032】さらに、この意味で、本発明は顕著な多様性を示している。その理由は、本発明を、次のような独立の方法に選択的かつ種々に用いることができるからである。

- 1) 第2の（隣接する）ヌクレオチドから第1のヌクレオチドを識別する。
- 2) 任意の鎖またはゲノムに対して、識別されたヌクレオチドの位置を検出する。
- 3) 第1のデュプレット、コドン、遺伝子を、第2の（隣接）デュプレット、コドン、遺伝子から識別する。
- 4) 任意の鎖またはゲノムに対して、識別されたデュプレット、コドン、遺伝子の位置を検出する。

【0033】このためには、本発明は、高速および／または高処理速度のコード配列決定を行う、例えば、1時間以内に、生体分子の一部について少なくとも1000個の塩基、好ましくは生体分子の一部について100キロベースの塩基を、特に1日以内に完全なヒトゲノムを、例えば5分以内に3キロベース塩基の配列決定を行う能力を有している。

【0034】本発明の他の利点は、以下の考察より明らかになる。本発明方法の応用は、まず第1は、質または量のスイ・ジェネリス（*sui generis*）のヌクレオチド情報を生成することができる。この情報は、遺伝子検査または薬品設計、DNA配列相同性または生体分子計算に対する新規かつ有効な手法の中心的存在となる。

【0035】本発明の他の利点は、以下に説明される。

【0036】

【発明の実施の形態】明瞭にするため、本発明の以下の詳細な説明は、本発明の特定の部分と主に関係するセクションを含んでいる。しかし、本発明の別々の部分間の関係は、かなり重要であることを理解すべきであり、以下の詳細な説明は、その理解のもとで読むべきである。また、本発明の特徴が図面中の特定の図との関係で説明される場合には、内容が許す限りにおいて、一般には本発明に対し、および他の図に対し、同じ説明を行うことができるものと理解すべきである。

【0037】セクションIは、発明の概要から要約することのできる用語、節、概念の種々の定義および例を述べており、この発明の好適な実施例を参照するのに用いることができる。セクションIIは、ニア・フィールド走査プローブ技術を生体分子の調査に組合せることを含む本発明の態様について特に強調する本発明の概念的な概説を与える。セクションIIIは、本発明を実現するために用いることのできる新規な装置を、概説的に開示す

る。セクションIVでは、セクションIIIの装置に含まれる好適なニア・フィールド・プローブの詳細を開示する。標題が“化学”であるセクションVでは、配列決定のために生体分子を準備する好適な技術を開示する。標題が“相関”であるセクションVIは、前セクションを参考にし、本発明がいかにして、任意の生体分子の化学分析を、既知の生体分子の分光データと相関させることができるかを開示する。セクションVII およびVIIIは、自由溶液およびゲルで本発明を好適に実現することをそれぞれ開示する。最後に、セクションIXは、前セクションを参考にし、装置およびシステムをさらに詳細に開示する。

【0038】I. 定義

1. “コード配列”：生体分子に関して、コード配列は、巨大分子または等価な化合物、例えばペプチドに対してアミノ酸、核酸に対してヌクレオチド、または炭水化合物に対して糖残基の基本ビルディング・ブロックの順序を意味する。コード配列は、生体分子の一部すなわちエンドモルフィック（*endomorphic*）と1対1に適合するマップを有することができ、あるいはまた、生体分子の一部に対してイソモルフィック（*isomorphic*）とすることができる。この点を説明するために、任意のヌクレオチド列がAAGCATATCGを有するものと仮定する。すると、エンドモルフィック・コード配列は、AAGCATATCGよりなり、他方、イソモルフィック・コード配列は、オールターナティブ・ヌクレオチドすなわちACTTGを有することができる。

【0039】2. “生体分子の一部”：生体分子は、高分子である巨大分子よりなる。本発明の方法は、巨大分子の全部、または巨大分子の少なくとも所定部分のコード配列を調べるのに用いることができる。例えば、本発明の方法は、DNAの断片のコード配列を調べるのに用いることができる。

【0040】3. “電気泳動”は、分子の正味電荷に基づいた分子の分離を含んでいる。本発明の目的に対しては、例えばゲルまたは好適には自由溶液内で電気泳動を行うことができる。

【0041】4. “ニア・フィールド・プローブ技術”：ニア・フィールド・プローブ技術は、回折制限を越えて試料を分解することができ、および原子分解イメージングすることのできる測定法を与えることができる。要するに、この技術は、試料の数十ナノメートル内にサブ波長サイズのプローブを配置することができる。このような短い距離にわたる移動では、放射線は、回折し、漸近ファー・フィールド特性を有することがない（したがって、“ニア・フィールド”）。適切なプローブは、鋭い金属チップ、または未被覆シリコンおよび／または硝酸シリコン・チップ、または導電層または分子系で被覆されたチップとすることができる。ニア

・フィールド・プローブ能力を、例えば、走査型トンネル顕微鏡 (STM)、原子間力顕微鏡 (AFM)、開口または無開口ニア・フィールド光学顕微鏡、ニア・フィールド・アコースティック顕微鏡、サーマル顕微鏡、または磁気力顕微鏡 (MFM) によって実現することができる。“走査”の概念は、プローブおよび生体分子が、相対運動し得るという事実に基づいている。例えば、米国特許第5,319,977号,4,343,993号,5,003,815号,4,941,753号,4,947,034号,4,747,698号明細書およびAppl. Phys. Lett. 65 (13), 26 September 1994を参照することができる。

【0042】5. “高分解能化学分析”は、好ましくは、物理的方法による空間的に分解される分光、例えばニア・フィールド顕微鏡技術を用いて、分子のスペクトルまたはスペクトルの一部の分子特異性を分析することによって、化学種を認識することを含んでいる。

【0043】6. “生体分子の広域スペクトル内容”は、スペクトルのX線,UV,可視,IRまたはマイクロ波から変化する、モニタされる分析に固有の周波数を有する調整励起放射源によって調べられる場合に、スペクトルの特徴づけ、例えば予め定められた分析の吸収特性、または放出特性、または熱特性、または磁気特性を意味している。

【0044】II. 本発明の概念的な概説

前述したように、本発明は、調査中に生体分子の一部の高分解能化学分析を行うために、ニア・フィールド・プローブ技術を、生体分子の少なくとも一部の調査と組合せ、化学分析を参照生体分子の広域スペクトル内容に相関させて、正確なコード配列決定を行う。

【0045】たとえ論理的に考えたとしても、いかにして必要な組合せを行うことができるかは、本発明を除いては、技術的に知られておらず、また明らかでない。言い換えると、所望の結果すなわち正確なコード配列決定は、ニア・フィールド・プローブと生体分子とを単に並置するだけでは、実際に行うことはできない (イメージングと比較せよ)。その理由は、推定上のこのような試みが、ぼやけた無情報の出力信号を単に発生するからである。

【0046】本発明は、生体分子の少なくとも一部のコード配列を決定するのに適した好適な新規な装置によって、この問題に対処し解決する。これら装置の好適な実施例を以下に説明する。

【0047】III. 装置としての発明の物理的な要素の概説

図1に注目すると、図1は、特に、化学的に複雑なバックグラウンド溶液14に対し、生体分子12を区別するために、組合せて本発明を実現することのできる物理的要素の概略10を示す図である。

【0048】生体分子12は、調査用および好ましくは可動の、すなわち走査 (矢印参照) ニア・フィールド・プローブ16の下側を、移動する。図1は、1つのこのようなニア・フィールド・プローブを示している。しかし、複数のニア・フィールド・プローブを適当に同時動作させることによって、調査を便利にすることができる。ニア・フィールド・プローブ16は、励起源として機能でき、あるいはまた外部励起源 (図8, 図10, 図12, 図13参照) として用いることができる。

【0049】ニア・フィールド・プローブ16からの識別信号18を、検出器20によって検出することができる。この検出器は、例えば、干渉計のような普通の分光計を備えている。検出器20は、検出信号22を発生して、コンピュータ24に格納し処理させる。例えば、IBM RS 6000をプログラミングして、タンパク質の場合にアミノ酸を、核酸の場合にヌクレオチドを含む生体分子のビルディング・ブロックの配列を解析する。

【0050】図1において、生体分子は、溶液14の入った容器26に最初に導入される。この場合、磁界28のような外部放射による伸張処理と、生体分子12を支持部30に配置する特定の処理とを用いて行うのが好ましい。この装置は、電源32によって発生された供給電界によって、例えば、移動の前および移動中に、生体分子12の効率的な固定化および伸長を容易にすることができる。これらの点は、標題が“化学”のセクションVにおいて詳述する。

【0051】IV. 好適なニア・フィールド・プローブおよび検出

図1は、ニア・フィールド・プローブ16と、励起源と、検出器20との使用を示している。好適なこのような装置についてのさらなる情報は、図2, 図3によって説明される。

【0052】好適な無開口ニア・フィールド走査プローブ顕微鏡および検出器34は、図2, 図3にそれぞれ示されている。無開口ニア・フィールド走査顕微鏡が好ましい。というのは、特に、試料の吸収特性を測定する能力を、サブナノメートルの空間分解能に拡げて、1つのヌクレオチドの分解能 (ヌクレオチド長 $\alpha$ は1~2オングストローム) を実現できるからである。また、開口ベース・システムを、低分解能、例えば約 $\lambda/40$ で用いることができることを、本願発明者らは知っている。特に、図2および図3の顕微鏡は、無開口ニア・フィールド光学顕微鏡である。この顕微鏡では、光源が微小開口を透過した光ではなく、鋭いティップから放散される球面光を放出する。

【0053】図2, 図3の無開口顕微鏡34の動作を理解するには、その機械的・物理的要素をまず初めに概説し、次にその動作理論を説明する。

【0054】この顕微鏡は、高開口数ノマルスキ対物レ

レンズ36（例えば、液浸対物レンズ）を有している。この対物レンズは、透明基板、例えばガラス・カバー・スリップ38の遠面に2つの回折制限スポットを形成するのに用いることができる。非接触またはタッピング・モードに適切な、AFMカンチレバー42の鋭いシリコン・ティップを、独立の電氣的フィードバック・ループ44を用いて、2つのスポットの一方に近づけることができる。

【0055】アトラクティブ・モードAFMを、“タッピング・モード”で好適に用いて、ギャップ・フィードバックを形成する。このモードでは、例えば共振周波数が $f_r$ の共振カンチレバー42を、共振周波数 $f_r$ よりも十分低い周波数 $f_z$ で、試料の方へ、および試料から離れるように動かすことができる（圧電変換器PZTを用いて）。周波数 $f_r$ の振動信号をロックイン増幅器46で検出でき、その平均値をフィードバック・ループ44で用いて、ティップ・試料の間隔を制御することができる。周波数 $f_z$ での圧電駆動増幅器48を調整することによって、ティップ／試料相互作用状態を、ハード・タッピングからソフト・タッピングまたは実際の非接触イメージングに変えることができる。

【0056】顕微鏡の動作理論は、以下のように詳述することができる。一般に、図3に示すように、プローブ・ティップ40に近接して置かれた生体分子50を、プローブ・ティップ40の端部から放射電界の変化を測定することによって調べることができる。

【0057】特に、プローブ・ティップ40に入射するスポットからの反射電界は、2つの成分を有している。すなわち、プローブ・ティップ40からの弱い放射電界 $E_s$ と、カバー・スリップ38の裏面からの強い反射電界 $E_r$ とである（図3参照）。フォーカスされたガウスビームによるグイ（Gouy）シフトの故に、反射電界 $E_r$ は、放射電界 $E_s$ に対して $\pi/2$ だけ位相が進む。小さい振幅の散乱光に対しては、プローブ・ティップに入射するスポットからの反射ビームの全位相 $\angle E'$ は、振幅 $E_r$ の第2の反射光スポットの位相に対して、 $\Delta\phi = E_s / E_r$ だけ位相が遅れる。したがって、ティップ端からの放射電界 $E_s$ を、感応性差動光干渉計52において $\Delta\phi$ を測定することによって、直接に推論することができる。カバー・スリップの裏面上の特徴、すなわち生体分子50は、生体分子50がプローブ・ティップ40に対しラスタ・スキャンされると、放射電界 $E_s$ を変動させる。これらの変動は、コンピュータに連続的に記録される。コンピュータでは、データを生成して、生体分子50の高分解能化学分析を行う。この化学分析は、そのコード配列を決定するために、用いられる\*

$$\begin{bmatrix} \alpha_{\parallel} \\ \alpha_{\perp} \end{bmatrix} = 4\pi a^3 \frac{(m^2 - 1)}{(m^2 + 2)} \begin{bmatrix} (\cos \theta)_{\parallel} \\ (f)_{\perp} \end{bmatrix} \quad (1)$$

【0063】ここに、 $m$ は球の複合屈折率であり、分極率は、散乱角 $\theta$ に対する入射波偏光方向によって選択さ

\*（セクションVIの説明を参照）。

【0058】プローブ・ティップ端からの放射電界 $E_s$ は、ティップ軸およびカンチレバー42から分散された光のスプリアス背景の頂部に一般に存在する。本願の発明者らは、背景信号を3つの方法で減少させた。まず、第1に、図2に示すように、光照明および検出に、共焦装置54を使用する。この共焦装置は、ティップ端の100nm内に検出領域を制限することができる。第2に、約ティップ半径である振幅だけ周波数 $f_z$ で $z$ 軸方向にティップを動かすならば、ティップを試料に非常に接近させると、ティップ端からの後方散乱光は、遠い領域から散乱された光と比べて、生体分子上で大きな変動を有することができることを、本願発明者らは認識している。第3に、周波数 $f_x$ で約ティップ半径だけ横方向に生体分子を振動させ、加算周波数 $(f_x + f_z)$ で干渉計信号を検出することによって、興味のある空間周波数（すなわち、ティップの半径に相当する）で信号をさらに増大させることができる。

【0059】さらに図2には、垂直偏光を放射するレーザ56が示されている。この垂直偏光は、アイソレータ58（偏光を90°回転させる）、ビームスプリッタ60、空間フィルタ54を経て、ノマルスキ対物レンズ36の方へ直線状に送られる。対物レンズ36は、光をカバー・スリップ38の裏面上の2つの回折制限スポット上にフォーカスする。2つのスポットからの反射光は、ピンホールを経て、ビームスプリッタ60に戻る。ビームスプリッタは、反射光をウォラストン・プリズム62上に送る。ウォラストン・プリズムは、検光子として用いられ、その軸はノマルスキ対物レンズ36の軸に対し45°に配置されている。

【0060】ウォラストン・プリッジ62から出射する2つのスポットは、差動フォトダイオード回路64で検出され、位相差 $\Delta\phi$ に比例する信号を発生する。このような差動干渉計の動作原理は周知であるので、説明はしない。 $mw$ 範囲の代表的なレーザ出力に対して、最小の検出可能な位相差 $\Delta\phi$ は、約 $10^{-8}$  ラジアン/ $\sqrt{Hz}$ である。

【0061】幾つかの簡単な考察を用いることによって、無開口顕微鏡34で実現することのできる極限分解能を評価することができる。ティップ端を半径 $a$ の球であると近似し、入射電界を $E_i$ と仮定すると、散乱球面波は、振幅 $E_s = E_i k^2 a / 4\pi$ を有する。ここに、 $k$ は空気中の光の伝搬常数であり、 $\alpha$ は次式によって与えられる球の磁化率である。

【0062】

【数1】



13

れなければならない。カバースリップ38からの反射波は、振幅 $E_r = (E_i / 5) (\omega_s / NA)$ の同心球面波である。ここに、 $\omega_s = \lambda / \pi NA$ は、光スポット半径であり、NAは対物レンズ36の開口数である。2つのスポット間の予測位相差 $\Delta\phi$ は、簡単に $E_s / E_r$ すなわち $\Delta\phi = 5 k^3 \alpha NA^2 / 8 \pi$ である。半径aおよび

【0064】

【外1】

 $\alpha_i$ 

【0065】のシリコンまたは金属チップ（すなわち、 $m^2 \gg 1$ ）を採用すると、 $\Delta\phi \approx (5/2) k^3 \alpha^3 NA^2$ である。mWレーザ出力を有するコヒーレント・ショットノイズ制限位相検出装置に対して、 $\Delta\phi_{\text{sil}} \approx 10^8$  ラジアン/ $\sqrt{\text{Hz}}$  であると示することができる。このことは、NA=0.85、 $\alpha \approx 1.7$  オングストロームのHe-Neレーザ光（ $\lambda = 633 \text{ nm}$ ）に対して、分解能が1つのヌクレオチド検出に、および原子レベルにさえ達するというを示唆している。

【0066】V. 化学

このセクションでは、電気泳動による分離、およびニア・フィールド・プローブによる検出と共に配列決定するために、生体分子例えばDNAを準備する好適な手順を説明する。

【0067】巨大分子の分離は、自由溶液内での電気泳動の変形に基づいている。ここで、電気泳動速度は、電気力と摩擦力との比に依存する。例えば、二本DNA鎖は、多くとも0.5エレクトロン/塩基対の有効電荷を有しているので、分子への電気力は単位長あたり一定であり、したがって電気泳動速度は、高い摩擦係数を有する単分散化学物質またはタンパク質（例えば、ストレプトアビジン）を添加することによって、サイズのみに依存させることができる。というのは、この作用は追加の摩擦を発生させるには、最も望ましいからである。磁気分子または微小球体への末端標識された巨大分子の付着は、外部マグネットによる操作（スターおよび前進のような）の好適な手段を与えることができ、これにより分離処理の高分解能を得る。分離速度および分解能は、バンド幅を制御するファクタに依存している。

【0068】上述の議論に従って、本発明は、試料設置のような電気泳動の初期条件を、特定の化学的方法を用いて制御するメカニズムを提供する。このために、図4は、本願発明者がいかにして生体分子を配置して、試料の寸法の範囲内のバンドをフォーカスするかを、基本的に示している。DNAの場合、典型的に数個の塩基から完全なゲノムへの断片を、すべての現在の方策を用いて作成し、配列決定作用の成果を得ることができる。図4において、モノサイズの磁気粒子またはビーズ66、例えばフェリチンまたはDynabeads（登録商標）をそれぞれ用いて、基板（図示せず）の表面に試料68

14

を固定し、組合された静電界および静磁界の強度の下で、分子の配置および伸長を可能にすることができる。図4の試料68は、一端に吸光タグ72を有し、他端に固定化学物質74例えばビオチンを有する末端標識された生体分子70よりなる。

【0069】強力な電界（例えば、 $10^6 \text{ V/m}$ または溶液の誘電体破壊の限界まで）がスイッチ・オンされると、試料の移動速度は、例えばゲノムDNAのように長く、DNA分子を引き伸ばすのに必要な、引き伸ばし電磁力を加えることによって、リニアに、かつ、ランダムなブラウン運動とは区別できるように保持される。この処理は、Dynabeads準備キットの製造業者（Dynal AS, Oslo, Norway）によって推奨される方法またはデリバティブを用いることによって、あるいは他の等価な公表された方法によって、行うことができる。

【0070】図4の試料68を、共有結合で（固体表面上の、カルボキシル基、ヒドロキシル基、またはアミノ基による）、またはストレプトアビジン-ビオチン相互作用タイプ（ストレプトアビジン76により被覆された粒子）による非共有結合で、磁気粒子に共役させ、これにより錯化学アセンブリ78を形成することができる。

【0071】この場合、図4のストレプトアビジン76、すなわちビオチンに対し4つの親和力結合部位を有するタンパク質を、ビオチン化DNA断片（例えば、PCRにより準備される）と反応させることができる。錯ビオチン-ストレプトアビジンの強力な結合定数（すなわち $K_d < 10^{-15} \text{ M}$ ）により、この結合は、種々の緩衝状態、および配置処理における引き伸ばし力に耐える。代表的な二本鎖DNAである長い核酸に対しては、DNA末端付着の20~65%の成功率で、アミノおよびカルボキシル・ビーズに対する、5'リン酸塩および5'NH<sub>2</sub>修飾核酸のカルボジイミド中間末端付着により、良好な結合をそれぞれ得ることができる。

【0072】結合条件、および磁気粒子へのヌクレオチドの他の共有末端付着（例えば、ウレタン・タイプの結合）の適切な選択によって、V. Lundらにより“Nucleic Acid Res. , 16(22)10861-80, 1988”に述べられているように、支持粒子66への試料の100%末端付着の歩留りを達成することができる。

【0073】さらに、例えば既知のサイズ分布で、適切にビオチン化された試料を、DNAの場合に少なくともA-T対およびG-C対に優先的に結合する吸光染料で染色することによって処理することができる。蛍光染料での標識は、高感度に対し高い量子収率と吸光係数を優先的に有する、広バンド励起源と両立することを要求する。このような関係においては、現在市販されている方法を容易に利用することができる。区別可能な化学種、例えばアミノ酸またはオリゴヌクレオチドが、その吸収



特性が波長の関数として測定されるときに、配列とは無関係の染色を実現することができる。

#### 【0074】VI. 相関

本発明は、生体分子の一部の高分解能化学分析（ニア・フィールド走査プローブ技術を用いることによって与えられる）を、参照生体分子の広域スペクトル内容と相関させて、コード配列決定を行う処理を含んでいる。この処理を、限定“相関”に含まれる概念を強調しつつ、かつ、図5、図6、図7を参照して、概説し、続いて詳述する。

【0075】概説において、まず初めに、アナレプティックな（analeptic）問題、すなわち、参照生体分子の広域スペクトル内容について、“どこから”、“いかにして”、“なに”を与えるかを説明する。

【0076】“どこから”に関して、参照生体分子の広域スペクトル内容を、ニア・フィールド・プローブによって識別される任意の生体分子のスペクトル内容から導き出すことができ、したがって内的基準（参照）として利用することができる。あるいはまた、参照生体分子の広域スペクトル内容を、独立または第2の既知の生体分子のスペクトル内容から導き出すことができる。

【0077】“いかにして”に関して、参照生体分子の広域スペクトル内容を、ニア・フィールド技術またはファー・フィールド技術（いずれも実用化されている）によって生成することができる。

【0078】“なに”に関しては、ニア・フィールド・プローブを用いて、例えば吸収特性、または放射特性、または熱特性、または磁気特性をそれぞれ有する、任意の生体分子の一部の高分解能化学分析を行うならば、参照生体分子の広域スペクトル内容が、関連する（好ましくは、同一の）特性、すなわち吸収特性、または放射特性、または熱特性、または磁気特性であり、意味のあるまたは興味のあるコレログラムを、通常のこのような特性に基づいて作成することができる。

【0079】詳細に、かつ一例として、図5は、DNAを含む生体分子、すなわちグアニン、シトミン、アデニン、チミンを形成する4つのヌクレオチドに対し、吸収スペクトル80、82、84、86を有する参照分光データを示している（Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Nucleic Acids, Vol. 1, Gerald F. Fasman, CRC Pressより）。上述したように、これらのスペクトルは、ニア・フィールド技術またはファー・フィールド技術（いずれも実用化されている）により得ることができる。図6は、出力信号88（ニア・フィールド走査プローブ技術を用いて与えられる）を示しており、任意の分光データを含んでいる。“相関”の処理は、参照分光データ80～86に対する図6の出力信号88の確認の確立またはマッピングを含んでいる。この場合、図6の出

力信号88は、図5のデータ86すなわちチミンに、コレログラム90によって図7に示されるように、唯一にマッピングする。

【0080】図5～図7の例に示されるように、“相関”を、（性質上、分光的に量的および／または質的である）参照データ集合と試料データ集合との間の関連として、“相関”を定義している。分析のプロセスを図7によって説明することができる。図7は、一般的な検査、すなわち参照試料データと測定試料データとの間に、なんらかの関連が存在するか否かの検査を示している。

【0081】出力結果の読取りから始まる全相関プロセスを、好ましくは95%より大きくなるように選ばれる精度で、2つのデータ集合の等価を表す相関係数を計算することによって続行することができる。曖昧さが生じたならば、出力を追加のステップによって相関プロセスに戻して、例えば拡張シート番号として、あるいはコレログラム・プロット連続相関として、索引データに対して統計上適切なデータを生成することができる。

【0082】生体分子の配列が決定されると、配列を種々に操作して、遺伝子マッピングの場合に生物学的情報を得る、あるいはタンパク質のアミノ酸配列をマッチングさせることができる。複数の生体分子または1つの生体分子の一部の間の相同（類似）の検出、または生体分子のすべてのパターンの検出を、好ましくは米国特許出願第923, 203号明細書に開示されたアルゴリズムに基づくアルゴリズムを用いて行うことができる。

#### 【0083】VII. 自由溶液を利用する発明

図8を参照する。図8は、自由溶液を利用する本発明を実現するのに採用された装置92を示す。

【0084】装置92は、励起源94を備え、この励起源は、スペクトルのUV、可視、またはIR部分における調整周波数を持つCWまたはパルスレーザを有している。励起源94は、第1ビーム・スプリッタ96を経て光エネルギーを送出する。ビーム・スプリッタは、入射ビームを参照ビームと信号ビームとに分割する。参照ビームは、ミラー98を経て、干渉計のような検出器100に送られる。信号ビームは、対物レンズ102に入射する。この対物レンズは、液浸レンズを有しており、振動ニア・フィールド・プローブ104と、生体分子を含む吸光化学種106とに対し、同一直線上に配列することができる。

【0085】自由溶液電気泳動の際に、化学種106を、流体通路108を流れる液流内を移動する間に、モニタすることができる。プローブ104の端部から発散する微小電界と相互作用する試料によって生成された放散電界を、対物レンズ102、ビーム・スプリッタ110を経てファー・フィールドに順次に伝搬させて、干渉検出器100において参照ビームと結合させる。干渉検出器では、結合ビームの振幅または位相を測定すること

17

によって、電界を検出することができる。

【0086】検出器100は、振動周波数 $f_j$ で信号を生成する。この信号は、ロックイン増幅器112の一方の入力として接続される。ロックイン増幅器112の他方の入力、周波数 $f_j$ の基準信号とする。ロックイン増幅器112は、試料化学種106の光特性を表す出力信号を発生する。この出力信号は、高い空間周波数を選択することによって背景信号を低減させるために、ハイパス・フィルタ114によってろ波される。測定された信号変動を時刻とともに記録して、種々の移動化学種の連続的な信号検出を空間的に分離し、図8に示すようにコンピュータ118で生体分子配列116を読み取り、格納し、および/または操作することができる。

【0087】本発明をさらに良く理解するために、自由溶液電気泳動とニア・フィールド検出とを組合せる数学的な関係を、図9を参照して以下に説明する。ニア・フィールド検出の基本概念は、米国特許第4,947,034号明細書に開示された方法に関係している。

【0088】図9において、理想的な開始条件、すなわちすべての分子が同一面（すなわち、 $x$ 軸方向で $\delta$ 関数）で正確にスタートするものと仮定する。電界 $E$ の存在下で、分子は、分子の長さ $M$ に依存する速度 $V$ （ $M$ ）でドリフトする。同時に、バンドは、拡散（拡散定数 $D$ ）により拡がる。したがって、分子の2つの長さ $M$ および $(M+1)$ を含むバンドを分離するのに必要な時間（ $t$ ）を計算することができる。

【0089】 $v = \mu(M)E$

セクションV、特に図4で述べたように、末端標識されたDNA錯体の場合には、自由溶液中のこのような錯体の移動度は、摩擦係数 $\alpha$ および末端標識による有効電荷 $\beta$ の関数である。以下に示す説明において、自由溶液移動度を、

【0090】

【数2】

$$\mu = \mu_0 \frac{(M - \beta)}{(M + \alpha)}$$

【0091】で表すことができる。したがって、

【0092】

【数3】

$$\frac{\partial v}{\partial M} = E \frac{\partial \mu}{\partial M}$$

$$\delta v = E \frac{\partial \mu}{\partial M}$$

【0093】である。ここに、 $\mu(M)$ は移動度であり、 $\delta v$ は、長さが $M$ と $(M+1)$ の2つの分子に対する速度の差である。分離すべき2つのバンドに対しては、拡散（ $\sqrt{SDt}$ 、ここに $S$ は10のオーダの定数）

18

による拡がり $\delta x$ は、速度分散 $\delta v$ 、すなわち

【0094】

【数4】

$$t - \delta v = \sqrt{SDt}$$

ここに、拡散係数は、

$$D = \frac{\mu_0 K_B T}{\rho(M + \alpha)}$$

$$\text{および} \quad t = \frac{SD}{\delta v^2}$$

$$\text{または} \quad t = \frac{SD}{\left(E \frac{\partial \mu}{\partial M}\right)^2}$$

【0095】によって生じる拡がり以下でなければなら

【0096】分離に必要な長さは、次式によって表すことができる。

【0097】

【数5】

$$L = vt = \mu E \frac{SD}{\delta v^2}$$

$$\text{または} \quad L = \frac{\mu SD}{E} \left[ \left( \frac{\partial \mu}{\partial M} \right) \right]^{-2}$$

【0098】拡散拡がり、

【0099】

【数6】

$$\delta x = \frac{SD}{\delta v}$$

$$\delta x = \frac{SD}{E} \left[ \left( \frac{\partial \mu}{\partial M} \right) \right]^{-1} \quad (3)$$

【0100】である。

【0101】バンドの幅が、零ではなく $w_0$ である開始条件を選ぶと、次式のように書くことができる。

【0102】

【数7】

$$\delta x = \sqrt{SDt} \left[ \left( 1 + \frac{w_0^2}{SDt} \right) \right]^{1/2}$$

【0103】そして、前述したのと同じ議論によれば、次式が得られる。

【0104】

【数 8】

$$L = \frac{\mu SD}{2E \left[ \frac{\partial \mu}{\partial M} \right]^2} \left[ (1 + (1 + \gamma^2)^{1/2}) \right] \quad (4)$$

ここに、

$$\gamma = \frac{2Ew_0}{SD} \left( \frac{\partial \mu}{\partial M} \right)$$

$$\frac{\partial \mu}{\partial M} = \mu_0 \frac{(\alpha + \beta)}{(M + \alpha)^2}$$

【0105】巨大分子、 $\nu \ll 1$  に対しては、

【0106】

【数 9】

$$L \approx \frac{Sk_B T (M + \alpha)^2 (M - \beta)}{E \rho (\alpha + \beta)^2} \quad (5)$$

【0107】となる。

【0108】したがって、 $M \gg \alpha$ 、 $M \gg \beta$  に対し、一定の移動距離  $L$  に対し識別することのできる塩基の最大数は、

【0109】

【数 10】

$$M_{\max} \approx \left[ \left( \frac{\rho V (\alpha + \beta)^2}{SK_B T} \right) \right]^{1/3} \quad (6)$$

ここに、 $V = E L$ 

【0110】である。

【0111】式 (4) は、1 に近い小さい数値ファクタを除いて、Mayer s らによって導かれた式 (3) (Anal. Chem. 66 (10), 1777-1780, 1994) に類似している。これらの計算に基づき、かつ、標準的な光回折制限測定方法を用いることによって、約 3000 個の DNA 配列決定の場合に、100 kV の下で 1 ミクロンの初期分散バンド幅で 5 分以内に分離できることが提案される。

【0112】本発明によれば、溶液の誘電体破壊に近い電圧、例えば  $10^4 \sim 10^5$  V/cm を供給し、検出限界を増大させることによって、理論上の分離性能を改善することができる。例えば、電界強度を 10 倍大きくすると、分離長さは 10 倍減少し、拡散拡がりも 0.1 ミクロンになり、他方、分離期間は、 $1/100$  に減少する。したがって、この出願の発明者は、0.8 nm の空間分解能でのニア・フィールド測定を開示し、少なくとも 100 倍速く、ファー・フィールド検出におけるよりも長い分子長さを配列決定することのできる配列決定速

度を実現できることを可能にした。

【0113】VIII. ゲルを利用する発明

図 10 を参照する。図 10 は、ゲルを利用する本発明を実現するのに用いることのできる装置 120 を示す。

【0114】図 10 の装置 120 は、光源 122 を備え、この光源は、スペクトルの x 線、UV、可視、IR またはマイクロ波部分における CW モードまたはパルスモードにおいて一定または調整周波数で動作するレーザ・コヒーレント・ビームを有している。光源 122 は、ビーム・スプリッタ 124 に励起放射線を送る。ビーム・スプリッタは、ビームを参照ビーム 126 と信号ビーム 128 とに分割する。

【0115】参照ビーム 126 は、ミラー 130 上で反射し、干渉検出装置 132 に導かれる。信号ビーム 128 は、ビーム・スプリッタ 134 と、光学素子 136

(好ましくは屈折率整合液体を有し、および好ましくは液浸レンズを有する) とを順次透過し、試料を照明するゲル 140 のバンド 138 の表面上に、光屈折制限スポット・サイズで、信号ビームをフォーカスする。試料を有するバンドの照明は、好ましくは、臨界角より大きい角度とし、これにより微小フィールドを与える。標準的な電気泳動バッファ・キット (Biorad, Pharmacia Biotech) の 2 つの容器を接続する、スラブ・ゲルまたはゲル・チューブ (1 mm ~ 数ミクロンの内径を有するガラスまたは水晶チューブ、代表的には 8% ポリアクリルアミド/6M ウレア・ゲル) に、試料は設けられている。パワー源によって試料がゲル 140 を移動するようにすることができ、これにより静電界またはパルス電界を作ることができる。

【0116】入射信号ビーム 128 は、無開口ニア・フィールド・プローブ 142 の端部に入射する。ニア・フィールド・プローブ 142 は、好ましくは、原子寸法のオーダの小さい寸法を有しており、したがって好ましくは、鋭い金属ティップ、または未被覆シリコン・ティップ、または導電層で被覆されたティップを有し、これにより電磁界の閉じ込めを改善する。

【0117】機械的または圧電手段 144、例えば圧電

チューブを用いて、プローブ142を試料バンド138上で、xおよびy軸方向に動かし、ゲルの特定領域のバンドに配置することができる。圧電チューブを用いて、z方向にプローブ142を振動させることができる（例えば、100～300kHzで約1～100nmの振動振幅）。

【0118】信号ビームは、ティップにより前方に散乱され、試料を通して同じコリメート・レンズ136に反射して戻され、ビーム・スプリッタ134を経て干渉検出装置132へ送られる。検出装置132は、例えば光差動ノルスキ干涉計またはその他の干涉計によって、光ビームの位相または振幅を測定し、これにより原子またはサブ・ナノメータ空間分解能で試料の光学特性を表す出力信号を与えることができる。

【0119】図10は、また、テーパ・ガラス・プローブを有する開口ニア・フィールド・プローブ146を用いる装置を示している。このようなテーパ・ガラス・プローブの構造および寸法は、技術上周知であり、例えば米国特許第5,272,330号明細書に述べられている。図10は、光源122からの光を、好ましくは液浸レンズを有する光学要素136によって、試料バンド138上にフォーカスすることができることを示している。反射光または出射光を、開口ニア・フィールド・プローブ146で集めて、シリンドリカル・レンズ148、対物レンズ150、フィルタ152を経て、検出器154へ送ることができる。検出器154は、好ましくは、光電子増倍管またはアバランシェ・フォトン・ダイオード・カウンタを備えている。

【0120】本発明では、いわゆる集光一透過モードでのいくつかの実施例を示したが、必要な変更を加えて、集光一反射モードを容易に実現できる。例えば、米国特許第4,947,034号明細書を参照されたい。

【0121】この発明の本実施例の方法に対する試料準備を、既知の技術を参照して、例えばシーケンサの製造業者（Applied Biosystems, Pharmacia Biotech）によって開示された方法を用いて、行うことができる。代表的には、例えばHewlett-Packardから市販されている選択的誘導体化試薬を用いるN末端またはC末端配列決定法におけるEdmanの誘導体化法によって、タンパク質を準備することができる。他方、DNAのような核酸を“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”, Sambrook, Maniatis, Coulsen, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989に説明されているように、電気泳動の前に、化学的方法（マクサム・ギルバート法）または酵素的方法（サンガー法）によって準備することができる。DNAの場合、DNA断片の増幅反応を、公表された方法を用いるポリメラーゼ連鎖反応（PCR）によっても行うことができ

る。電気泳動ゲルは、超薄ゲルからスラブ・ゲルまで変化する種々の濃度で、ポリアクリルアミドまたはその等価ゲルにより準備することができる。試料などの断片を、ゲル・ウェル（4塩基に相当する4レーン）に、普通に設けることができる。自動化技術で用いられるオリゴヌクレオチドの蛍光染料標識が、また実際的である。

#### 【0122】IX. 好適な装置

次に、高処理DNA配列決定に用いることのできる原生体分子の全配列を追及することを可能にしながら、高速分離を与えることのできる、微小作製可能な装置について説明する。ニア・フィールド走査プローブ顕微鏡検出前の試料の正確な初期位置決めに通じる物理的処理と組合された自由溶液電気泳動の技術について説明する。この検出方法は、塩基コール（base call）を作るのに必要なデータ点の収集（セクションVI参照）、および例えば3000個の塩基のように長いDNA鎖についての、特定の配列の確実な操作において、従来技術よりも少なくとも100倍高速で、高い精度を与えることができる。

【0123】本発明によれば、明確に定められた自由溶液流の下で、その場ニア・フィールド顕微鏡技術を実施することは、電気泳動方法における、特に、DNA配列決定におけるアガロース・ゲルのようなゲル・マトリックスにおける重要な動作パラメータを改善する手段を与えることができる。高い電界強度では、電界による錯分子歪みによる分子サイズMに対して、電子移動度 $\mu$ は対数的に変化しない。自由溶液では、配向され伸長されたらせん構造において低重合体的な振るまいが観察され、電界強度に対して、単位電界Eあたりの速度 $v$ として定義される、移動度のほぼ一次従属を生じる。核酸の場合には、より大きな分子サイズは、より高い電荷密度に線形的に関係し、これにより一定の電荷／摩擦比を与え、およびサイズとは無関係の移動阻止分離を生成する。

【0124】本発明によれば、同時アクシャライズド（axialized）磁界励起と結合する高摩擦係数化学種を付着することによって、電荷／摩擦比の変更は、重大な流体力学的またはフィールドの異質性がないと仮定して、サイズとは無関係の自由溶液移動を形成することができる。本発明の数学的表記の種々の態様、およびこの方法の性能の評価は、セクションVIIにおいて説明した。次に、代表的に10cm長さの容器を用いるならば、100kVの供給電圧を保持し、0.1ミクロン以下の精度でバンドの幅を最初に定めて検出しながら、3秒内に3000個の塩基を配列決定するのに用いることのできる基本的な実験的構造について説明する。

【0125】図11は、このための適切な装置156を示す。この装置156は、好ましくは、小さなニア・フィールド・プローブ開口160として機能することのできる金属被覆ストリップを有する、光源158を備えている。プローブ開口160は、入口166と出口168

および1対の平行電極170を有する、流体通路164を有する容器162を覆っている。電極170は、好ましくは、真空蒸着されたアルミニウム電極またはシリコン電極よりなる。1流体通路あたりn個のプロープ、あるいはn個の流体通路あたりn個のプロープを用いることによって、高い処理能力を得ることができる。図示のように、この装置に光検出器172を組合せて、照明された生体分子試料174から放出された光を検出することができる。

【0126】流体通路164内の、電極および絶縁ガラスまたは酸化シリコンの面は、好ましくは、例えばフッオロシランで表面処理されて、非特異巨大分子接着を防止する。この方法は、酸化シリコン表面に共有結合カルボキシル基を導入して、負電荷密度を増大させて、DNA固定を防止することができる。

【0127】試料溶液を、入口166から導入して、数百キロベースの巨大DNAまで取り扱うことのできる流体通路164に吸引またはポンプで送り込む。同時に、電極を付勢して、生体分子試料174を、1つの電極面170上に配置することができる。

【0128】バイオ試料174は、好ましくは、フェリチンのような磁気分子または大きい単分散標識タンパク質に結合された磁気ビーズで末端標識され、および磁界Bが供給されると、一端を電極に固定して伸張される。自由溶液電気泳動は、流体力学的抵抗と、電極形状および電界条件（セクションVII 参照）のような静電要件とを満足する特定媒体内で実行しなければならない。

【0129】まず第1に、大きな磁界勾配Bおよび小さい電界Eは、1つの電極170での分子の配置を誘導することができる。次に、代表的に1000kV電源176によって発生される高電圧を、電極170に供給して、フィールドが、流れる生体分子174を、他の未被覆電極170の方へ引くようにする。

【0130】生体分子174、特に電界Eによって伸張されたDNAを、ランダムコイル・コンフォメーションに収縮させることができるので、一定の磁気励起Bを保持し、これにより、電界Eが大きいときの ( $E > 10^6$  V/M)、伸張分子コンフォメーションが保持される。

【0131】磁界Bの強度を、1つの電磁装置178を用いて発生させることができる。正味の磁気力を、電極170に対して生体分子を引っ張り、およびブラウン運動に打ち勝つのに十分強力であるという条件の下で、例えば最大2テスラ発生させることができる。

【0132】生体分子174は、検出領域の方へ移動する。この領域では、質的および量的なニア・フィールド測定値を、例えば光電子増倍管を用いて、生体分子長さに沿った染料標識の蛍光強度を測定するか、あるいは分光器を用いて、読取れる塩基の吸収特性を測定することによって得ることができる。

【0133】この物理的方法によって得られる空間分解

能（ニア・フィールド測定および自由溶液分離の利点と組合された生体分子操作につながる）は、回折制限以下の空間分解能内での各移動生体分子または断片の配置を可能にする。したがって、全コード配列の再構成が正確かつ高速となる。

【0134】図11の装置156のような装置の適用は、DNAプローブ/ターゲット・ハイブリッド形成技術の検出に見いだすことができる。この場合、DNA試料を変性する、すなわち2つの一本鎖へ分離することができ、前述した微小作製された酸化シリコン表面の流体通路164の固定化一本鎖核酸断片のアレイ上に堆積することができる。既知の配列のDNAプローブを有するタグされた (tagged) 試料間のハイブリッドの形成は、各固定プローブに相補のターゲット配列が試料内に存在することを示すことができる。光学的に読取れるタグ（スクシニルフルオレセイン誘導体または他の市販されている化学物質）を、ニア・フィールド光学技術を用いて実現することができる。

【0135】上述の固定問題は、いかにして核酸プローブを固定できるかとは無関係に、追加の電極構造（すなわち、試料の移動に対し垂直方向の）を用いることによって、同時静電干渉、およびガラスまたは（水晶）流体通路164に断片を固定するに際し、カルシウム・イオンまたはマグネシウム・イオンのような、二価の正イオンの付加を必要とする。正イオンは、負に帯電したDNAと負に帯電した基板との間の接着剤として働く。また、適切な環境（例えばアミルアミンおよび誘導体）の中でプラズマ放電によって、同様の表面処理を得ることができる。

【0136】図11の装置156は、好ましくは、集合デバイスを備えている。図12および図13を参照すると、これら図は、図11の装置156によって調べられた塩基配列の正確な読出しを与えるために用いることのできる装置を示している。

【0137】図12は、ニア・フィールド検出器が開口プローブ182を有する場合について読出しに適する装置180を示している。特に、図12の装置180は、小さいマイクロリソグラフィ・ウィンドウを有するニア・フィールド・プローブ182を備えている。このマイクロリソグラフィ・ウィンドウを経て、光信号を試料184に透過し、検出器186によって集めることができる。

【0138】ニア・フィールド・プローブ182のウィンドウの形状は、好ましくは、以下の点を考慮して選ばれる。すなわち、(i) 移動流体の流れる方向に平行なウィンドウの幅 (x) を、十分に小さくし、典型的には約20nmとし、これにより良好な分解能に対しニア・フィールド内に試料を制限し、(ii) 垂直幅 (y) を幾分大きくして、レーザビームと、高N.A.（開口数）液浸対物レンズ188により集められた放射とにより走

査される場合に、一定数の分子（184）について蛍光測定を得ることができる。おおよそ浸透深さの3倍の厚さ（30nm）の薄いアルミニウム層を、不透明なスクリーン材料として用いることができる。

【0139】ニア・フィールド・プローブ182の応答関数は、プローブ空間に対する試料に依存するので、光源要素の底部における薄い透過シリコン薄膜を、おおよそ、良好な分解能に対する開口サイズと同じサイズで作らなければならない。

【0140】レーザ光源190を、光ファイバ192  
10 で、ニア・フィールド・プローブ182に結合することができる。この光ファイバは、試料に接近するように調整でき、または、標準的な圧電チューブ194を用いて走査することのできる励起または集光素子として好適に機能する。

【0141】データ取込みの処理は、高N. A. 液浸レンズ188により集光された光強度を記録することによって、行うことができる。次に、光は、ミラー196と一連のノッチ・ファイバ198との組合せを経て送られ、放射光を残留レーザ励起光と区別する。光は、好ましくは、光電子増倍管または高量子収率の低ノイズ・フォ  
20 トダイオード（米国特許第5, 272, 330号明細書参照）を備える検出器186によって検出される。

【0142】ニア・フィールド・プローブ182が垂直方向に変動される（約10nm p-p）と、ニア・フィールド信号が、ロックイン増幅器200に送られて、AC信号が復調される。独立のフィードバック・ループ202を用いて、音響光変調器（AOM）およびコントローラ204により、プローブ試料空間を制御することもできる。

【0143】この実施例によれば、光路を、透過モードから集光モードに逆転することができるが、集光モードでのニア・フィールド測定の感度は、低くなる。集光モードは、図12に示すような、同様の共役光学要素（188', 196', 198', 186'）を用いることによって実現できる。

【0144】図13を参照すると、ニア・フィールド・プローブが無開口プローブ208よりなる場合に、読出しに適した装置206を示している。

【0145】無開口プローブ208は、好ましくは、支持薄膜212の上部に設けられた、微小作製されたサブ10nmスケールのストリップ210を備えている。薄膜212は、圧電セラミック素子214の作用によって、その共振周波数（例えば、100~300kHz, 10~50N/mにおけるバネ定数）に近い周波数で振動させることができ、これにより、供給電磁界により誘導される電気泳動の流れに平行な運動を生じさせる。

【0146】照明レーザ源216は、好ましくは、偏光を発生する。この偏光は、アイソレータ200（偏光を90°だけ回転する）、エキスパンダ222, およびビ  
50

ーム・スプリッタ224を経て、ノマルスキ液浸対物レンズ218（またはウォラストン・プリズム）を通る。次に、光は直交偏光ビームに分割され、流体通路を経て、微小作製されたストリップ210上の2つの焦点に結ばれる2つのスポットを生じる。

【0147】2つのスポットからの反射光は、ビームスプリッタ224を経て、アナライザ226に戻る。このアナライザは、ノマルスキ・プリズム218に対して軸が45°になるように配置されたウォラストン・プリズムを備えている。これにより、反射ビームは、差動フォトダイオード回路228によって再結合され、ティップからの放射電界に与えられた位相差に比例する出力信号を検出する。電気泳動の際に、生体分子試料がニア・フィールド・プローブ208に対して移動すると、ティップの電界の変動が、試料特性によって変更され、これら変更は、ロックイン増幅器230およびコントローラ232を備える電子装置によって、したがってコンピュータ234によって連続的に記録される。コンピュータ234は、バンドからの生データを相関させて、セクションVIで述べたように、生体分子のコード配列を決定する。

【0148】まとめとして、本発明の構成に関して以下の事項を開示する。

（1）少なくとも生体分子の一部のコード配列を確認するのに適した装置であって、

1) ニア・フィールド・プローブを有し、生体分子の一部の高分解能化学分析を行う手段と、  
2) 前記生体分子の一部の前記高分解能化学分析を、参照生体分子の広域スペクトル内容と相関させて、前記生体分子の一部のコード配列決定を行う手段と、を備える装置。

（2）1) 前記生体分子の一部と相互作用する放散電磁界を測定する手段を有する、少なくとも1つの開口ニア・フィールド走査プローブと、

2) 前記放散電磁界の変動を測定して、前記生体分子の一部の前記高分解能化学分析を行う光学干渉計検出器と、を備える上記（1）に記載の装置。

（3）前記高分解能化学分析を、前記参照生体分子の広域スペクトル内容と相関させるプログラマブル・コンピュータを備える、上記（1）に記載の装置。

（4）前記ニア・フィールド・プローブおよび前記生体分子の一部を相対的に走査する手段をさらに備える、上記（2）に記載の装置。

（5）前記走査する手段は、圧電チューブを有する、上記（4）に記載の装置。

（6）1) 前記生体分子の一部の蛍光を測定する開口ニア・フィールド走査プローブと、

2) 前記生体分子の一部から放出される蛍光光子を計数する光子・カウンタを有し、前記生体分子の一部の前記高分解能化学分析を行う検出器と、を備える上

記(1)に記載の装置。

(7) 前記高分解能化学分析を、前記参照生体分子の広域スペクトル内容と相関させるコンピュータを備える、上記(6)に記載の装置。

(8) 前記開口ニア・フィールド走査プローブおよび生体分子の一部を相対的に走査する手段をさらに備える、上記(6)に記載の装置。

【図面の簡単な説明】

【図1】生体分子の少なくとも一部のコード配列を確認するのに適した装置を示す図である。

【図2】無開口ニア・フィールド光学顕微鏡を備えるニア・フィールド走査プローブを示す図である。

【図3】図2の無開口顕微鏡についての基本概念を説明するための図である。

【図4】生体分子を、ニア・フィールド走査プローブによる調査のための準備試料に変更することを説明する図である。

【図5】DNAヌクレオチドに対する分光曲線を示す図である。

【図6】任意の生体分子に対する分光曲線を示す図である。

【図7】図5、図6に基づくコレログラムを示す図である。

【図8】本発明を実現するための装置を示す図である。

【図9】図8の装置における生体分子の拡散作用の数学的関係を示す図である。

【図10】ゲル実施例で本発明を実現する装置を示す図である。

【図11】本発明により構成された装置の他の実施例の詳細を示す図である。

【図12】本発明により構成された装置の他の実施例の詳細を示す図である。

【図13】本発明により構成された装置の他の実施例の詳細を示す図である。

【符号の説明】

12 生体分子  
14 バックグラウンド溶液  
16 ニア・フィールド・プローブ  
26 容器  
34 無開口ニア・フィールド走査プローブ顕微鏡  
36 対物レンズ  
38 ガラス・カバー・スリップ  
40 ティップ  
42 カンチレバー  
44 フィードバック・ループ  
46 ロックイン増幅器  
48 圧電駆動増幅器  
50, 70 生体分子  
52 光干渉計  
54 共焦装置(空間フィルタ)

56 レーザ  
58 アイソレータ  
60 ビーム・スプリッタ  
62 ウォラストン・プリズム  
64 差動フォトダイオード回路  
66 ビーズ(支持粒子)  
68 試料  
72 吸光タグ  
74 固定化学物質  
76 ストレプトアビジン  
78 錯化学物質アセンブリ  
94 励起源  
96, 110 ビーム・スプリッタ  
102 対物レンズ  
104 ニア・フィールド・プローブ  
106 吸光化学種  
108 流体通路  
112 ロックイン増幅器  
114 ハイパス・フィルタ  
116 生体分子配列  
122 光源  
124, 134 ビーム・スプリッタ  
126 参照ビーム  
128 信号ビーム  
130 ミラー  
132 干渉検出装置  
136 コリメート・レンズ  
138 バンド  
140 ゲル  
142 無開口ニア・フィールド・プローブ  
144 機械的または圧電手段  
146 開口ニア・フィールド・プローブ  
148 シリンドリカル・レンズ  
150 対物レンズ  
152 フィルタ  
154 検出器  
158 光源  
160 ニア・フィールド・プローブ開口  
162 容器  
164 流体通路  
170 平行電極  
172 光検出器  
176 電源  
178 電磁装置  
182 開口プローブ  
184 試料  
186 検出器  
188 液浸対物レンズ  
190 レーザ光源  
192 光ファイバ



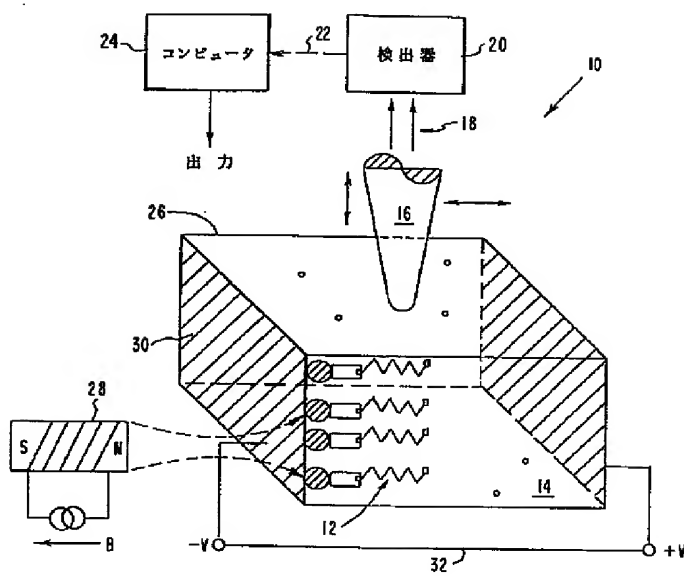
29

30

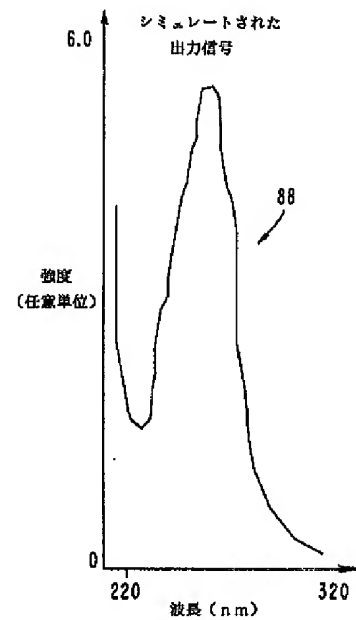
194 圧電チューブ  
196 ミラー  
198 ノッチ・ファイバ  
202 フィードバック・ループ  
204 コントローラ  
208 無開ロブローブ  
210 ストリップ  
212 支持薄膜  
214 圧電セラミック素子

216 レーザ  
220 アイソレータ  
222 エクспанダ  
224 ビーム・スプリッタ  
226 アナライザ  
228 差動フォトダイオード回路  
230 ロックイン増幅器  
232 コントローラ  
234 コンピュータ

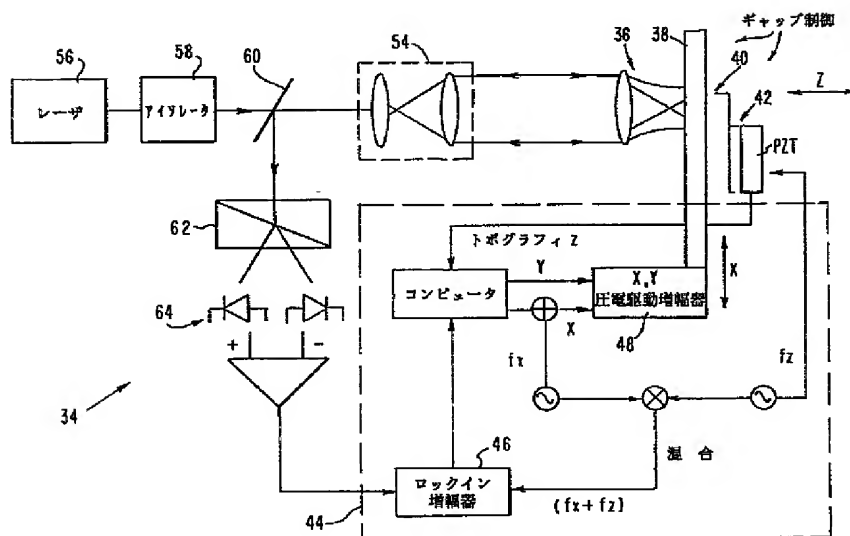
【図1】



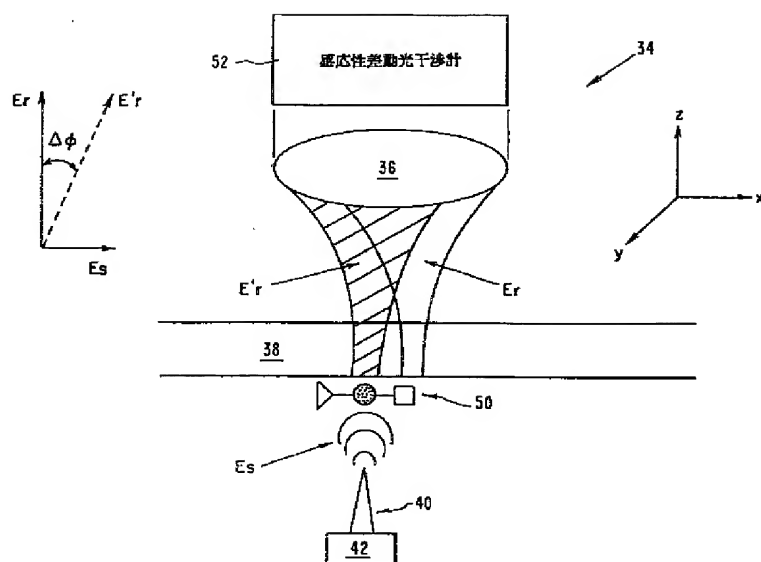
【図6】



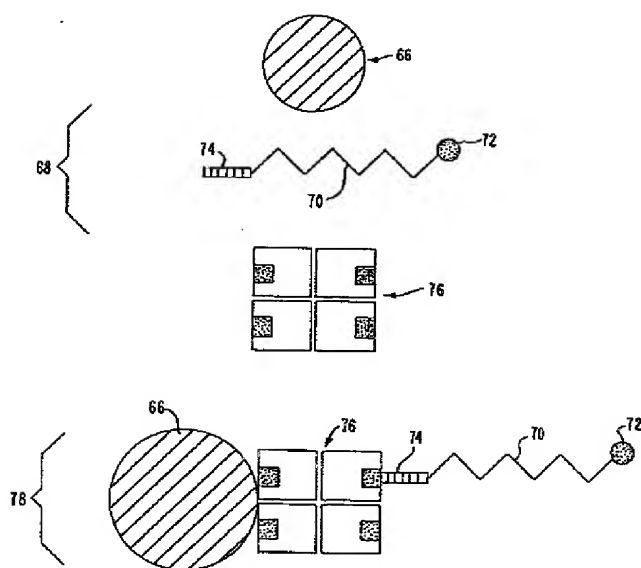
【図2】



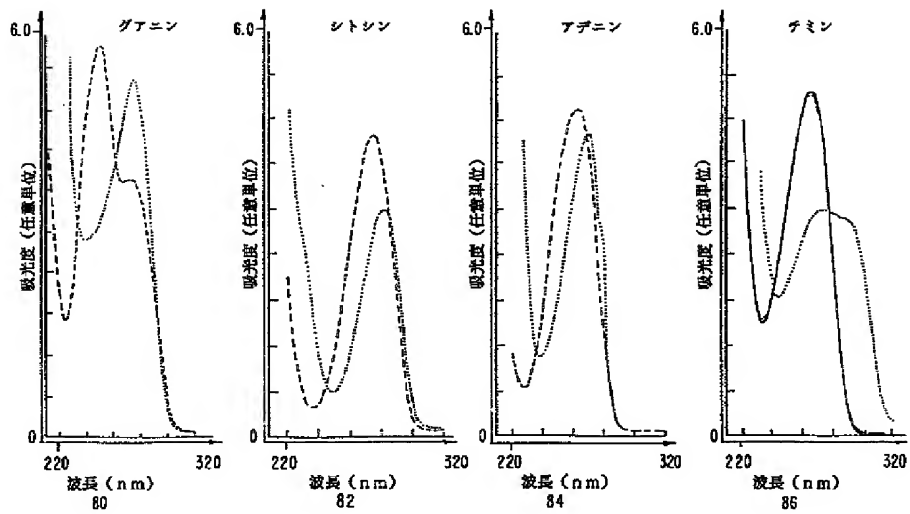
【図3】



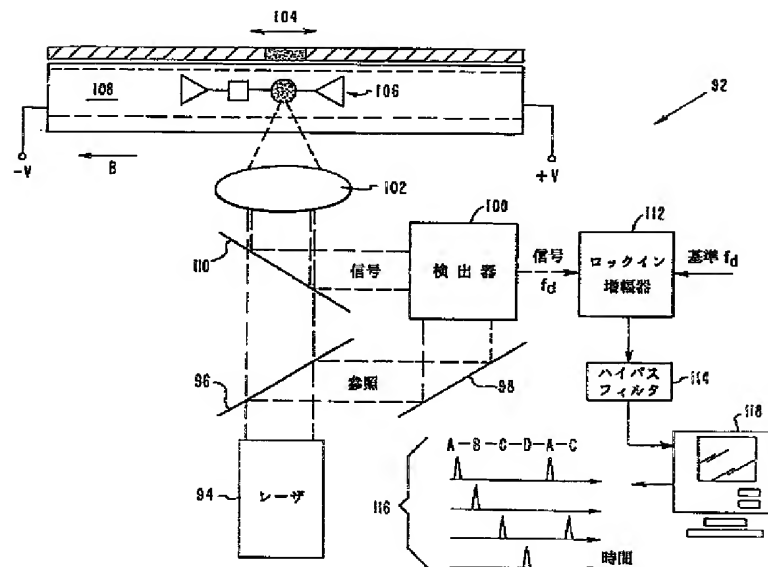
【図4】



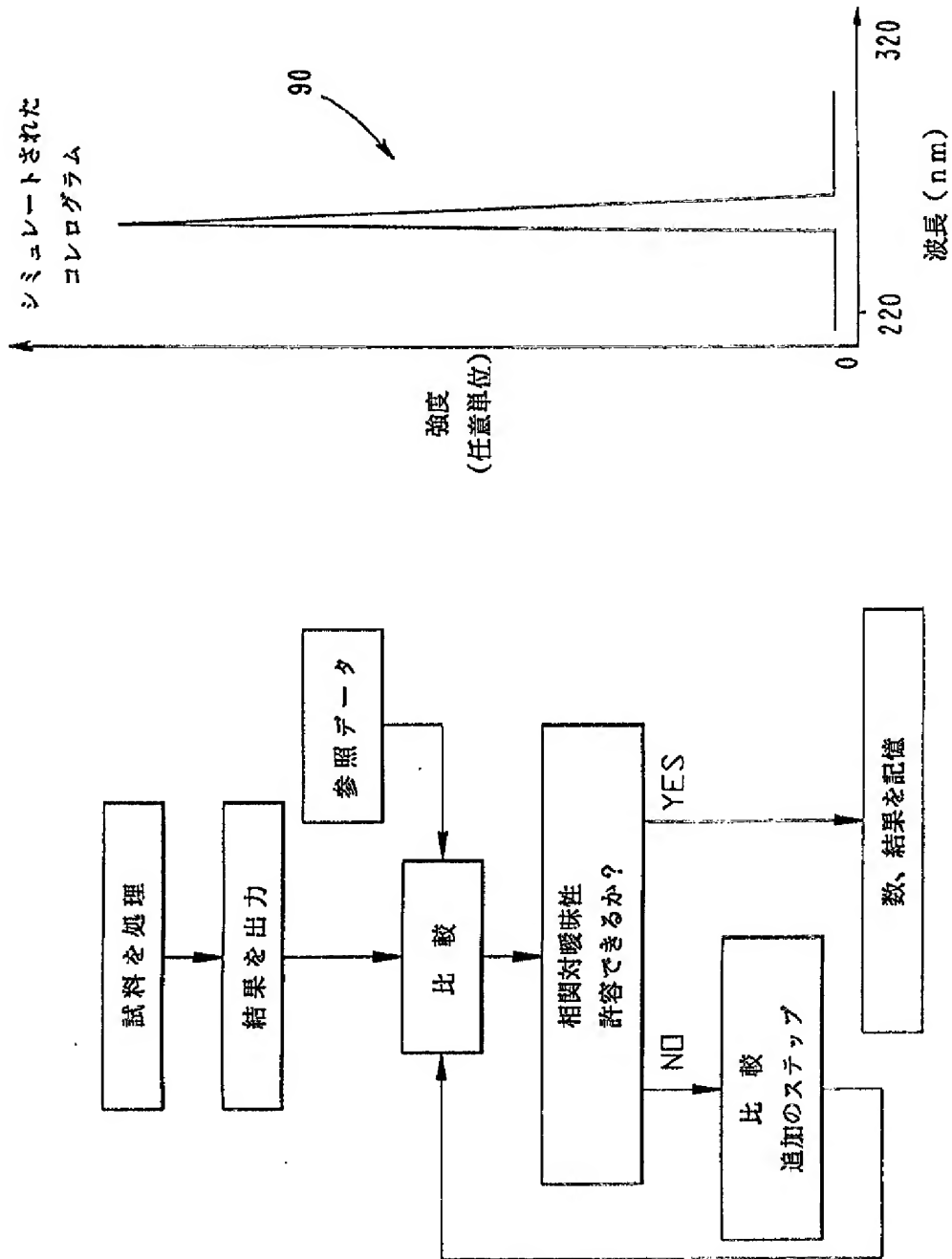
【図 5】



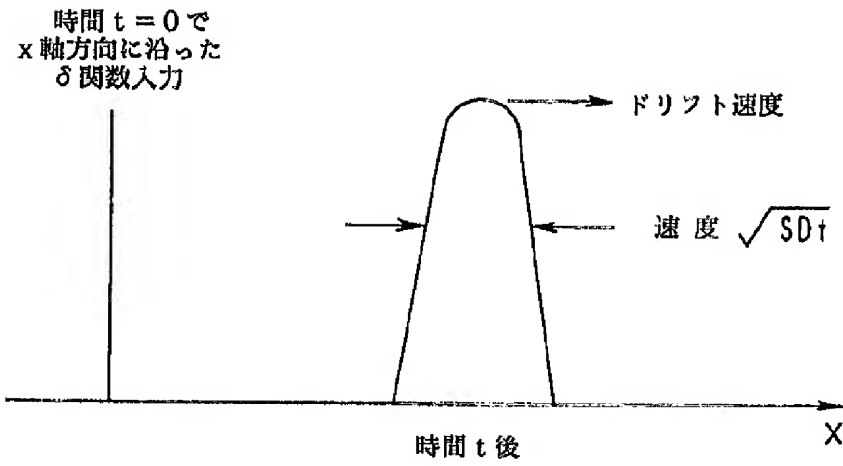
【図 8】



【図7】



【図 9】



【図 10】

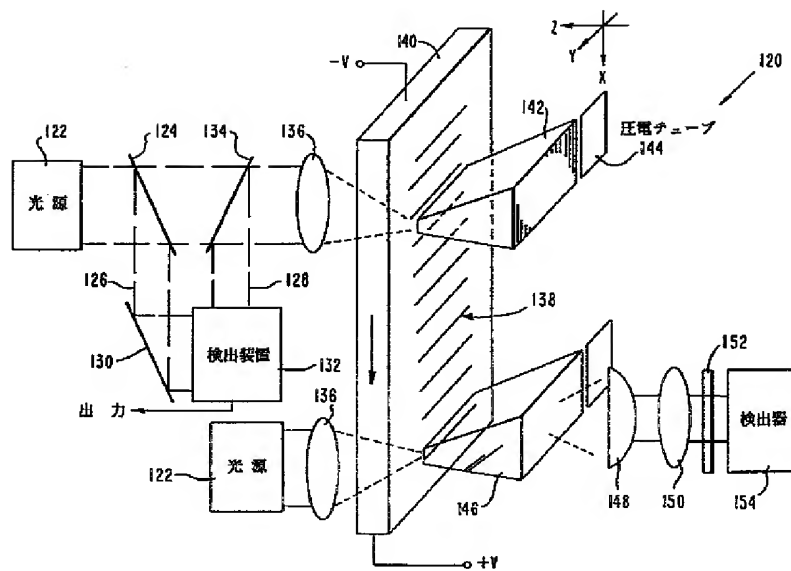
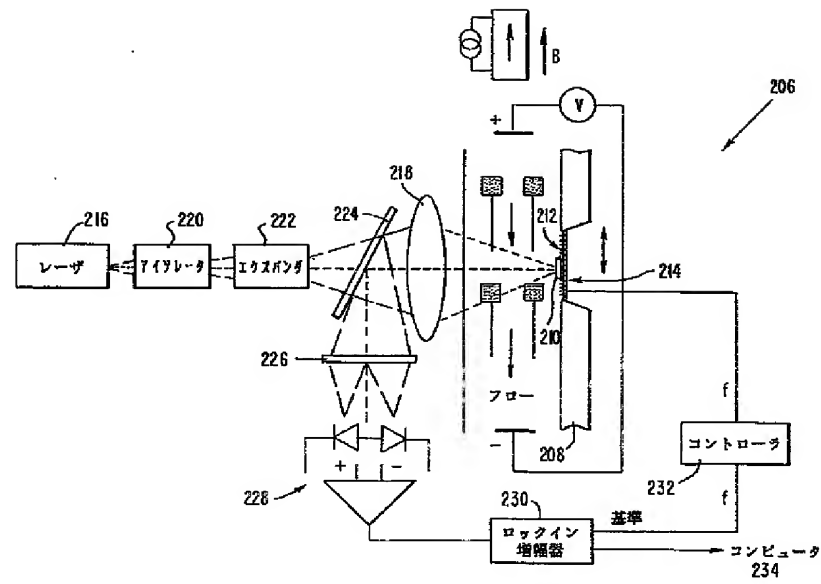


Figure 1 is a schematic diagram of a laser Doppler velocimeter system. The system includes a laser source (190) emitting a laser beam (196) through a lens (188) and a beam splitter (196'). The beam is focused on a target (192) via a lens (188'). The reflected beam (196'') is collected by lens (188) and beam splitter (196'). The system also includes a photodetector (186), a lock-in amplifier (200), a computer (202), and a controller (204). The target (192) is a rotating disk with a surface velocity vector  $v$  and a normal vector  $B$ . The system is powered by a voltage source  $V$  and a current source  $I$ .

【図 1 3】



フロントページの続き

(72)発明者 フレデリック・ゼンハウサーン  
 アメリカ合衆国 10547 ニューヨーク州  
 モヒガンレイク シーニック ロード  
 201